
学位論文

扁平上皮癌細胞における上皮・間葉移行による高悪性化機構の解析

瀧 雅行

キーワード：扁平上皮癌細胞, 上皮・間葉移行, 高悪性化, MMP-2, Ets-1

Analysis of Mechanisms of Malignancy Enhanced by Epithelial-mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma Cells

Masayuki TAKI

Abstract : Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is thought to be an important mechanism for gastrulation, neural crest cell migration, invasion and metastasis of cancer cells. This process involves the loss of cell-cell adhesion together with the gain of mesenchymal and migratory properties. Although a correlation has been suggested between EMT and acquisition of more invasive and metastatic activities in cancer, the mechanisms of the more malignant changes by EMT have not been clarified enough in squamous cell carcinoma (SCC) cells. In this study, we analyzed the mechanisms of malignancy enhanced by EMT in SCC cells.

Highly invasive SCC cells showed fibroblastic morphology and decreased expression of E-cadherin, elevated expressions of vimentin, MMP-2, SIP1 and δ EF-1 compared to the SCC cells with epithelial morphology. Over-expression of Snail in A431 and OM-1 cells resulted in the acquisition of EMT, in terms of down-regulation of E-cadherin and up-regulation of vimentin, MMP-2, SIP1 and δ EF-1, accompanied with morphological changes to fibroblastic shapes. These cells showed highly migratory behavior and a diffuse type invasion in three-dimensional culture. We further studied the relationships among Snail, SIP1 and TGF- β . Tet-off-induction of Snail, SIP1 or a treatment of TGF- β induced EMT in SCC cells. However, we found that Snail induced SIP1, while SIP1 did not induce Snail expression. TGF- β induced SIP1, but not Snail, in SCC cells, whereas the expression of Snail, but not SIP1, was strongly increased by TGF- β in highly invasive SCC cells with mesenchymal characteristics.

Analysis of the MMP-2 promoter revealed that an Ets-1 binding site, located between -1,255 and -1,248 relative to the transcriptional start site, was the critical sequence for the promoter activation by Snail, SIP1 and TGF- β . Over-expression of Snail and SIP1 or treatment of TGF- β resulted in the induction of Ets-1 protein expression. Nuclear proteins extracted from the cells with induced expression of Snail and SIP1 showed increased DNA binding activities to the Ets-1 binding site. Furthermore, over-expression of Ets-1 resulted in increased promoter activity and protein expression of MMP-2.

These results indicated that the more malignant changes by EMT were induced through down-regulation of cell-cell adhesion and up-regulation of matrix proteinases and cell migration in SCC cells. EMT induces Ets-1 expression, which activates the MMP-2 promoter and induce MMP-2 expression.

緒 言

癌細胞の周囲組織や血管への浸潤は、その後の転移の成立とともに、悪性度の指標あるいは予後と密接に関連する。これには腫瘍細胞間の接着の減弱、細胞運動能の亢進、基質分解能の亢進が重要な因子であるとされている。E-cadherin は上皮細胞間の接着に関与する因子であり、その発現の減弱は種々の癌で認められ、腫瘍の悪性度の進行と深く関わっている。最近、zinc-finger 型の転写因子 Snail および zinc finger E-box binding protein (以下 ZEB と略記する) ファミリー、basic helix-loop-helix 型の転写因子 E12/E47¹⁾ および Twist²⁾ が E-cadherin のプロモーター領域に存在する E-box に結合し、E-cadherin の転写を抑制し上皮・間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition, 以下 EMT と略記する) を誘導することが報告されている。EMT とは上皮細胞が間葉系の形態と性格をもつように変化する現象のことであり、個体発生における原腸陥入や組織および器官の発生過程において認められる^{3,4)}。種々の癌において Snail と E-cadherin の発現の逆相関が報告されており⁵⁻⁸⁾、Snail の導入による E-cadherin の発現低下、線維芽細胞様形態への変化、浸潤能の亢進についても報告されている⁹⁻¹²⁾。一方、ZEB ファミリーには ZEB-1/δEF-1 と ZEB-2/Smad interacting protein 1 (以下 SIP1 と略記する) が存在する¹³⁾。SIP1 は、TGF-β シグナルの伝達因子である Smad と結合し、E-cadherin の転写を抑制する¹⁴⁻¹⁸⁾。また、TGF-β も種々の上皮細胞で EMT を誘導することが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。しかし、Snail と SIP1 の相互関係について、あるいは Snail と SIP1 の発現に対する TGF-β の作用については現在十分には解明されていない^{14, 22, 23)}。

一方、E-cadherin の他に、上皮系細胞に特異的に発現する分子として Desmoplakin, Cytokeratin18, MUC1, Claudin, Occludin, α-catenin, β-catenin, Wnt-4^{9, 24-27, 29)} が、間葉系細胞に発現する分子として Vimentin, Matrix metalloproteinase-2 (以下 MMP-2 と略記する), Fibronectin, Wnt-5a^{9, 12, 28, 29)} が知られており、これらの分子は EMT によってそれぞれ発現が低下または増加することが報告されている。中でも MMP-2 は主として基底膜の構成成分であるタイプ IV コラーゲンを分解する酵素であり、腫瘍細胞の間質や血管内への浸潤の促進に関与することが報告されている^{30, 31)}。

これらのことから、EMT の誘導に伴い発現が変化する分子群は、細胞間接着の低下や基質の分解、遊走能の亢進を介して、癌細胞の浸潤・転移能を増大させると考えられる。しかし EMT により発現が上昇する分子は、E-box を介した E-cadherin などの転写の抑制機構とは異なる機構によって調節されると考えられるものの、その上昇機構に関しては、これまでほとんど検討されていない。本研究では扁平上皮癌細胞における Snail, SIP1 および TGF-β と EMT との関係について、また EMT の誘導に伴う MMP-2 の発現上昇のメカニズムについて分子

生物学的に検討を行った。

実験材料および実験方法

1. 細胞および培養法

外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 細胞、口腔扁平上皮癌細胞株 OM-1 細胞、HOC719-PE 細胞、HOC719-NE 細胞、HOC313細胞、TSU 細胞を用いた^{5, 12, 29, 32, 33)}。HOC719-PE 細胞と HOC719-NE 細胞は、E-cadherin を不均一に発現する HOC719 細胞から分離・樹立した⁵⁾。またテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を導入することによって樹立した不死化歯肉線維芽細胞 GT-1 細胞³⁴⁾ を用いた。培養は 10% (容量/容量、以下 v/v と略記する) 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum: 以下 FBS と略記する; PAA Laboratories Inc., PA, USA), 100 μg/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA) を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: 以下 DMEM と略記する; SIGMA, St. Louis, MO, USA) を用い、5% CO₂ の存在下、37℃で培養した。培地交換は 3 日毎に行った。

2. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

継代 3 日後のセミコンフルエントに達した細胞を PBS で 3 回洗浄後、TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で溶解し、クロロホルムを加え遠心により蛋白除去を行い、上清よりエタノール沈殿にて RNA を回収した。1 μg の RNA を室温で 15 分間 DNase I (Invitrogen) 処理した後、25 mM EDTA を添加し、65℃ 10 分間処理による DNase I の失活を行った。ついで、ランダムヘキサマープライマー (Invitrogen) を加え、70℃ 10 分間処理した後、逆転写酵素 SuperScript™ II (Invitrogen) を用いて 25℃ 5 分間、42℃ 50 分間、70℃ 15 分間の条件下で逆転写反応を行い、cDNA を得た。さらに 37℃ 20 分間 RNase H (Invitrogen) 処理した後、1.1 × ReddyMix™ PCR Master Mix (1.5 mM MgCl₂) (ABgene, Epsom, Surrey, UK) を用い、サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて PCR を行った。PCR は 94℃ で 30 秒、アニーリングを 30 秒、72℃ で 1 分を 23 ~ 28 サイクル、最後に 72℃ 10 分で DNA 断片の増幅を行った。内部標準遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下 G3PDH と略記する) を使用した。PCR 産物は 100 ng/ml ethidium bromide を含む 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、UV 撮影装置 FAS-III (東洋紡績, 大阪) を用いて可視化した。本研究で用いたプライマーと PCR の条件を表 1 に示した。これらの他のプライマーは、すでに報告したものを使用した^{5, 12, 29)}。

3. ベクターおよびトランスフェクション法

1) マウス Snail 発現ベクターは Dr. A.G. De Herreros より供与された Snail cDNA の C 末端に HA タグを付与し

表1 プライマーの塩基配列およびPCR の条件

target mRNA	sequence of primer	annealing temp., size
SIP1	f: 5'-CTCCAGGAGTAATACTCCTTCTCC-3' r: 5'-TAGGAAGCTCATCTGATCCAGTCC-3'	58 °C 466 bp
Ets-1	f: 5'-GCCTATCCAGAATCCCGCTATAC-3' r: 5'-CGCTGCAGGCTGTTGAAAGATGA-3'	58 °C 395 bp
MMP-3	f: 5'-AGATGCTGTTGATTCTGCTG-3' r: 5'-ACAGCATCAAAGGACAAAGC-3'	55 °C 516 bp
PU.1	f: 5'-GCTTTCTATGACCTGGACAGCTG-3' r: 5'-TCCAACGGTAAGTCTTCTCTCTC-3'	58 °C 347 bp
ETV1	f: 5'-TCGGGAAGGACCCACATACCAA-3' r: 5'-TGTCTGTCTTCAGCAGTGGACG-3'	58 °C 344 bp
ERG	f: 5'-GTAACCCTAGCCAGGTGAATGGC-3' r: 5'-CCTCTGGAAGTCGCTCTGGTCA-3'	60 °C 326 bp
Ets-2	f: 5'-AGGTATGCCAGTGGCTTCTCTGG-3' r: 5'-GAAACTCCTGCTCAGAGCTGAGT-3'	58 °C 381 bp
E1AF	f: 5'-TCTTCCAGCAGCCCCTGGACAT-3' r: 5'-TGAGTCGTAGGCGAAGTCCGCTCT-3'	60 °C 260 bp

た pcDNA3-mm snail-HA を用いた¹⁰⁾。コントロールベクター (pcDNA3) あるいは Snail 発現ベクターを A431, OM-1 細胞に Tfx-20 (Promega, Madison, WI, USA) を用いてトランスフェクションし、培地中に600 µg/ml G418 (SIGMA) を添加しセクションを行い、耐性クローンを分離しコントロール細胞 A431pcD, OM-1pcD と Snail 発現細胞 A431SNA, OM-1SNA を得た。

2) Snail の Tet-off 発現ベクター pTRE2-SNA は、pcDNA3-mm snail-HA のインサートを pTRE2 ベクター (Clontech, Palo Alto, CA, USA) に組み込むことにより作製した。SIP1 の Tet-off 発現ベクターは、Dr. K. Verschuereen より供与された全長の SIP1 cDNA あるいは N 末端と C 末端の zinc finger の配列に一部変異を加え DNA 結合能を消失させた SIP1 cDNA を pTREHyg ベクター (Clontech) に組み込み、Myc タグを付与して作製した pTREHyg-SIP1 および pTREHyg-SIP1/MT を用いた。A431 細胞に Tfx-20 を用いて pTet-off ベクター (Clontech) をトランスフェクションし、60個の G418 耐性クローンを分離した。それぞれのクローンに対し、pTRE2-Luc ベクター (Clontech) を一過性にトランスフェクションし、doxycycline (Clontech) 依存性の発現誘導を行いルシフェラーゼ活性のスクリーニングを行った。この発現誘導において、培地中の血清として Tet System Approved FBS, US-Sourced (Clontech) を用いた。分離したクローンのうち、最も doxycycline 依存性のルシフェラーゼ活性の

誘導能が高かった A431-Tet-off-26 細胞を以後の実験に使用した。A431-Tet-off-26 細胞に pTRE2-SNA ベクターと pTK-Hyg ベクター (Clontech) をコトランスフェクションし、400 µg/ml の hygromycin B (Invitrogen) でセクションを行い耐性クローンを分離し A431-TetSNA 細胞を得た。コントロールの A431-TetTRE 細胞は pTRE2 ベクターと pTK-Hyg ベクターを用い、同様に分離した。A431-TetSIP1 細胞と A431-TetSIP/MT 細胞は、それぞれ pTREHyg-SIP1 あるいは pTREHyg-SIP1/MT ベクターを A431-Tet-off-26 細胞にトランスフェクションし分離した。

3) ヒト Ets-1 発現ベクターは、高発現している歯肉線維芽細胞より RT-PCR 法により全長の cDNA を増幅し、インフレーションになるように pcDNA6/V5-His B ベクターに組み込み作製した。プライマーとして、5'-TCTAGGT ACCATGAAGGCGGCCGTCGATCT-3' (forward) および 5'-AAGTGGGCCCTCGTCGGCATCTGGCTTGA-3' (reverse) を使用した。コントロールベクター (pcDNA6/V5-His B) あるいは Ets-1 発現ベクターを A431 細胞に Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。培地中に20 µg/ml Blasticidin S HCl (Invitrogen) を添加し、セクションを行い Blasticidin S 耐性クローンから、コントロールである A431pcD6/V5 細胞と Ets-1 発現クローンである A431Ets-1 細胞を得た。なお、得られたベクターのインサートは全て ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により塩基配列を確認した。

4. ウェスタンブロット法

セミコンフルエントに達した培養細胞を 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 µM leupeptin および 10 µM aprotinin を添加した RIPA buffer (1 % NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH7.5) で可溶化した。Bradford 法を用いて蛋白量を測定した後、最終濃度が 8 mg/ml となるように蛋白質溶液を調整した。蛋白質 80 µg の試料をサンプルバッファー (藤沢薬品工業, 大阪) で希釈し、加熱後 SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。蛋白質を Immobilon™ PVDF メンブレン (Millipore, Bedford, MA, USA) に SureBlot F1 System (藤沢薬品工業) を用いて転写した。5 % スキムミルク-0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝液 (以下 TBS-T と略記する) にて室温で 1 時間ブロッキング後、TBS-T で希釈した一次抗体を、室温で 3 時間反応させた。一次抗体として、抗 E-cadherin 抗体: HECD1 (タカラバイオ, 大津), 抗 HA 抗体: 3F10 (Roche, Mannheim, Germany), 抗 Myc 抗体: 9B11 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 抗 V5 抗体 (Invitrogen), 抗 c-Ets-1 抗体 (ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA, USA), 抗 MMP-2 抗体 (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA) を用いた。メンブレンを TBS-T にて洗浄

後、二次抗体としてそれぞれ抗ラット IgG (SIGMA), 抗マウス IgG (DAKO), 抗ラビット IgG (DAKO) を反応させた。TBS-T にて洗浄後, ECL Western blotting system (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, USA) と ECL mini-Camera (Amersham Biosciences Corp) を用いてシグナルを検出した。

5. 免疫蛍光染色法

2-well Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc, 東京) に播種したセミコンフルエントの細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定した。0.2% TritonX-100 にて 5 分間膜透過処理を行い, 1% 牛血清アルブミンを含む PBS にて 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキングバッファーにて一次抗体を希釈し, 4℃ で一晩反応させた。一次抗体として HECD1 を用いた。PBS にて洗浄後, 二次抗体として FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を用い, 室温で 45 分間反応させ, 励起波長 490nm にて蛍光顕微鏡 (ニコン, 東京) を用いて観察した。

6. 細胞遊走能の検討

3×10^5 cells/ml の細胞を 6-well 組織培養用プレート (Nalge Nunc) 上に播種した。コンフルエントになるまで培養後, ディッシュの中心部にピペットチップにて wound を形成した。24 時間培養後 PBS にて洗浄し, 位相差顕微鏡 (オリンパス, 東京) にて撮影した。

7. 三次元浸潤様式の検討

再構成三次元培養は Bell らの方法に準じて行った^{35, 36)}。タイプ I コラーゲン溶液 (高研, 東京) に 1×10^6 cells/ml の不死化歯肉線維芽細胞 GT1 を懸濁し, 12-well 組織培養用プレート (Nalge Nunc) 上に 2 ml 播種し, 37℃ で 1 時間インキュベートした。コラーゲンがゲル化した後, 1×10^6 cells/ml の癌細胞を重層させた。さらに 37℃ で 1 時間インキュベートさせ, ゲルをディッシュの側面, 底面より剥がし, 浮遊させた。2 日おきに培地交換を行い, 収縮コラーゲンゲルを作製した。1 週間後からは, セルストレーナー (Falcon, Bedford, MA, USA) 上に置き, 表面が空気に曝されるよう培養し, さらに 1 週間後, マイルドホルムにて固定し, パラフィン包埋し, 4 μ m 厚の垂直方向の切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

8. 転写活性の測定

正常ヒト歯肉線維芽細胞より抽出した DNA を用い, 転写開始点より 1,714 bp, 1,630 bp, 1,271 bp, 1,255 bp, 1,248 bp, 960 bp, 411 bp, 211 bp 上流までのヒト MMP-2 プロモーター領域を PCR 法にて増幅させた。用いたプライマーを以下に示す。

(-1,714): 5'-CAAGGTACCTCCAAGAGGGTCCTTTAACTG-3';

(-1,630): 5'-ATCAGGTACCGAAGCCCACTGAGACCCAAGCCG-3';

(-1,271): 5'-ACGTGGTACCAGAAGTCACCTTCTTCCAGGAAGCC-3';

(-1,255): 5'-CCGAGGTACCAGGAAGCCTTCCTTGATTGTCCTTA-3';

(-1,248): 5'-GGCAGGTACCCCTCCTTGATTGTCTTTAC TAGTTTAGGGGC-3';

(-960): 5'-TGGCACGCGTGGGTGCTTCCTTTAACATGCTAATG-3';

(-411): 5'-CATTCCTACGCGTTCCTGACCCCAAGGGAGT-3';

(-211): 5'-CTCTAACGCGTGGCCCCCTGACTGCTCTATTTC-3';

(reverse, +22): 5'-CAACCTCGAGCCACCGCCTGAGGAAGTCTG-3'

PCR 産物は ABI3100 により塩基配列を確認し, pGL2-Basic ベクター (Promega) に組み込みレポーターベクターを作製した。A431-TetSNA 細胞, A431-TetSIP1 細胞および 24 時間の TGF- β 処理を行った A431 細胞に, 4 μ g のレポーターベクターと 1 ng の pRL-CMV ベクターを Lipofectamine™ 2000 にてコトランスフェクションした。MMP-2 プロモーターに対する Ets-1 の影響を検討する実験においては, さらに 2 μ g の pcDNA6/V5Ets-1 ベクターあるいは pcDNA6/V5 ベクターをコトランスフェクションした。48 時間培養後, Passive lysis buffer (Promega) にて回収し, プロモーター活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にて測定した。回収産物を 9,000 \times g にて 10 秒遠心し, その上清 20 μ l と 100 μ l の Luciferase assay buffer (Promega) を混和し Luminoskan TL Plus (大日本製薬, 大阪) にて測定後, 100 μ l の Stop & Glo solution (Promega) を添加し, 内部コントロールの測定を行った。転写活性は内部コントロールに対する比で判定した。

9. Electrophoretic Mobility Shift Analysis (EMSA)

細胞の核抽出液の調節は, Dignam らの方法³⁷⁾ に準じて行った。Snail および SIP1 の発現を誘導させた細胞を 400 μ l の 20 mM Hepes (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 20% glycerol, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.2 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 0.5 mM PMSF, 60 μ g/ml aprotinin および 2 μ g/ml leupeptin を含む溶液で回収し, 15 分氷上に放置し 12,000 \times g 4℃ にて 10 分遠心し, 上清を回収し, 蛋白濃度の測定を行った。プローブの作製と結合実験は Kamata らの方法^{38, 39)} に準じて行った。Ets-1 結合配列を含む MMP-2 プロモーターの転写開始点より上流 1,261~1,241 bp における 20 bp の合成オリゴヌクレオチドを用い, 95℃ 10 分, 室温にて 6 時間以上放置しアニーリングを行った。そのプライマーとして, 5'-TTCTTCCAGGAAGCCTTCCT-3'

(forward) および 5'-AAGGAAGGCTTCCTGGAAGA-3' (reverse) を使用した。下線部は Ets-1 結合配列を示す。さらに [γ - 32 P]-ATP と T4 polynucleotide kinase (Amersham Biosciences Corp) を用いて 37°C 30 分反応させラベリングを行った。10 mg の核抽出液と 10 fmol のプローブを 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 300 μ g/ml acetylated BSA, 2 μ g poly (dI-dC) を含む binding buffer (20 mM Hepes [pH7.9], 20% glycerol, 0.1 M NaCl, 0.2 M EDTA) で混和し、全量を 20 μ l として室温にて 30 分反応させた。サンプルを非変性 4 % ポリアクリルアミドゲル内で 2 時間、150 V にて 67 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 33 mM sodium acetate を含むバッファーを用い電気泳動を行い、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィを行った。なお、競合実験には 30 倍濃度の未標識プローブおよび変異型プローブを用いた。そのプライマーとして 5'-TTCTTCCATTAAGCCTTCCT-3' (forward) および 5'-AAGGAAGGCTTAATGGAAGA-3' (reverse) を使用した。下線部は Ets-1 結合配列相当部位を示す。またスーパーシフトアッセイでは、結合反応後に抗 Ets-1 抗体をそれぞれサンプルに加えた。

結 果

1. 各種扁平上皮癌細胞の形態と遺伝子発現, 細胞遊走能, 浸潤能の検討

多くの扁平上皮癌細胞と同様に A431, OM-1 および HOC719-PE 細胞は上皮様形態を示すのに対し、高度浸潤型扁平上皮癌細胞である HOC719-NE, HOC313 および TSU 細胞は線維芽細胞様形態を示す (図 1 A)。RT-PCR による遺伝子発現の解析において、これらの細胞は E-cadherin の遺伝子発現の消失、Vimentin および MMP-2 の高い遺伝子発現を示した。また、E-cadherin の転写を抑制し EMT に関与する転写因子 Snail, SIP1, δ EF1 の高い遺伝子発現を認めた (図 1 B)。

次に、Snail 発現ベクターを A431 細胞および OM-1 細胞にトランスフェクションして得られた細胞を用いてさらに検討を行った。HA タグに対する抗体を用いたウェスタンブロットティングによって Snail の蛋白発現を確認した (図 2 A)。これらの細胞の形態は線維芽細胞様形態に変化し (図 2 B), E-cadherin の遺伝子発現の低下、Vimentin, MMP-2, SIP1, δ EF1 の遺伝子発現の上昇を認めた (図 2 C)。Wound assay による細胞の遊走能を検討したところ、上皮様形態を示す扁平上皮癌細胞に比較し、線維芽細胞様形態を示す HOC313 細胞および Snail 過剰発現により EMT を獲得した細胞では、明らかな遊走能の亢進を認めた (図 3)。細胞の浸潤様式を再構成三次元培養系にて検討した結果、A431 細胞および OM-1 細胞に比較し、線維芽細胞様形態を示す HOC313 細胞および TSU 細胞は、腫瘍細胞が個々にび慢性に浸潤する像を示した。Snail を過剰発現させ EMT を獲得した A431SNA1, OM-1SNA1 細胞もまた、個々にび慢性に浸潤する像を示し、EMT の誘導に伴う細胞浸潤能の

上昇と浸潤様式の変化が明らかになった (図 4)。

2. 扁平上皮癌細胞に対する Snail, SIP1, TGF- β による遺伝子発現および形態の変化

Snail の過剰発現に伴い SIP1 の発現が上昇したことに注目し、Snail と SIP1 の Tet-off 発現ベクターを作製し、これを導入した A431 細胞を樹立した。A431-Tet-off-SNA 細胞では培地から doxycycline を除くことで Snail の発現を誘導し、7 日後に HA タグに対する抗体を用いたウェスタンブロットティングを行い、Snail の蛋白発現が誘導されることを確認した (図 5 A)。Snail の発現誘導に伴い、細胞形態が線維芽細胞様形態に変化し、免疫蛍光染色法、ウェスタンブロットティングにて E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた (図 5 B, 5 C, 5 D)。これに伴い Vimentin, MMP-2, SIP1, δ EF1 の遺伝子発現の上昇を認めた (図 5 E)。コントロールの A431-Tet-off-pTRE 細胞ではこれらの変化は認められなかった。

同様に、A431-Tet-off-SIP1 細胞において doxycycline を除去し SIP1 の発現を誘導し Myc タグに対する抗体を用いたウェスタンブロットティングによって SIP1 の蛋白発現を確認した (図 6 A)。SIP1 の発現誘導に伴い、免疫蛍光染色法、ウェスタンブロットティングにて E-cadherin の蛋白発現の低下を認めたが、細胞形態の変化は Snail の誘導に比較して顕著ではなかった。(図 6 B, 6 C, 6 D)。さらに Vimentin, MMP-2 の遺伝子発現の上昇を認めたが、Snail および δ EF1 の遺伝子発現は変化しなかった (図 6 E)。また、A431-Tet-off-SIP1/MT 細胞ではこれらの変化はみられなかった。

Snail により Smad と相互作用を示す SIP1 の発現が誘導されたことから、扁平上皮癌細胞に対する TGF- β の影響を検討した。培地中に 2 ng/ml の TGF- β を添加し、各種遺伝子発現を検討した。上皮様形態を示す A431 および OM-1 細胞に添加すると、E-cadherin の遺伝子発現の低下、Vimentin, MMP-2, SIP1 の遺伝子発現の上昇を認めたが、明らかな形態変化はみられず、また Snail の遺伝子発現は変化しなかった。一方、線維芽細胞様形態を示す HOC313 および TSU 細胞では TGF- β の添加によって Snail の強い遺伝子発現の上昇を示したのに対し、SIP1 の遺伝子発現は誘導されなかった (図 7 A, 7 B, 7 C, 7 D)。

3. 扁平上皮癌細胞における EMT の誘導に伴う MMP-2 発現上昇のメカニズムの解析

次に、扁平上皮癌細胞における EMT を介した MMP-2 の発現上昇のメカニズムについて詳細な検討を行った。転写開始点の上流 1,714 bp までの MMP-2 プロモーター (図 8 A) を含むレポーターベクターを作製し、Snail および SIP1 の発現を誘導した細胞、TGF- β 処理を行った細胞を用いて MMP-2 の転写活性をデュアル ルシフェ

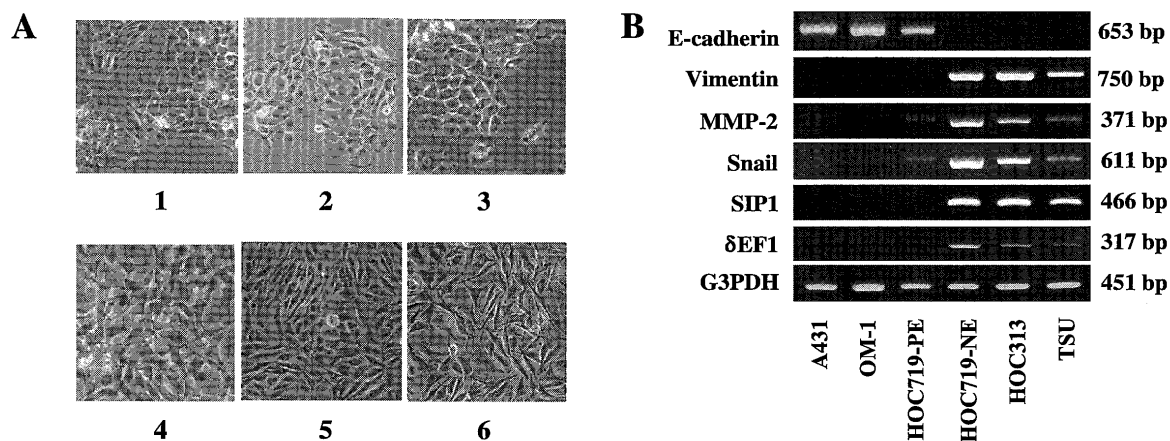


図1 各種扁平上皮癌細胞の形態および遺伝子発現の検討

(A) 各種扁平上皮癌の細胞形態の位相差顕微鏡像。1：A431細胞，2：OM-1細胞，3：HOC719-PE細胞，4：HOC719-NE細胞，5：HOC313細胞，6：TSU細胞。高度浸潤型扁平上皮癌細胞（4，5，6）は線維芽細胞様形態を示した。(B) 扁平上皮癌細胞における遺伝子発現。6種の扁平上皮癌細胞におけるE-cadherin, Vimentin, MMP-2, Snail, SIP-1およびδEF1の遺伝子発現をRT-PCR法にて検討した。高度浸潤型扁平上皮癌細胞においてE-cadherinの遺伝子発現の消失，Vimentin, MMP-2, Snail, SIP-1およびδEF1の高い遺伝子発現を認めた。

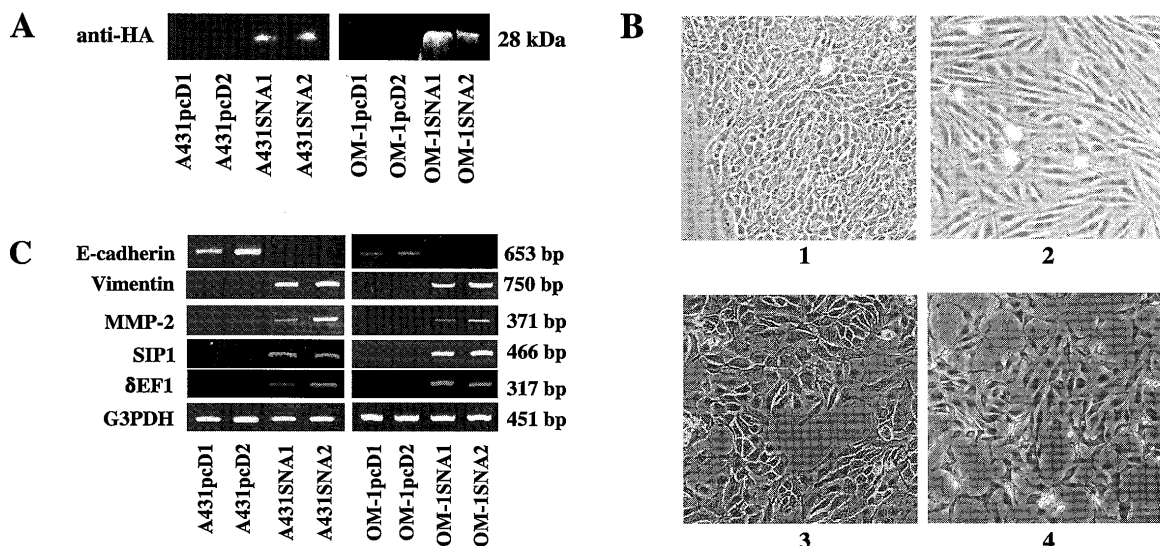


図2 Snail過剰発現細胞の形態および遺伝子発現の検討

(A) Snail過剰発現細胞（A431SNA1, A431SNA2, OM-1SNA1, OM-1SNA2）におけるSnailの蛋白発現は，HAタグに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて確認した。(B) コントロール細胞（1：A431pcD1, 3：OM-1pcD1）に比較し，Snail過剰発現細胞（2：A431SNA1, 4：OM-1SNA1）は線維芽細胞様形態に変化し，EMTの誘導を認めた。(C) Snail過剰発現細胞およびコントロール細胞における遺伝子発現をRT-PCR法にて検討した。EMTの誘導に伴いE-cadherinの遺伝子発現の低下，Vimentin, MMP-2, SIP-1およびδEF1の遺伝子発現の上昇を認めた。

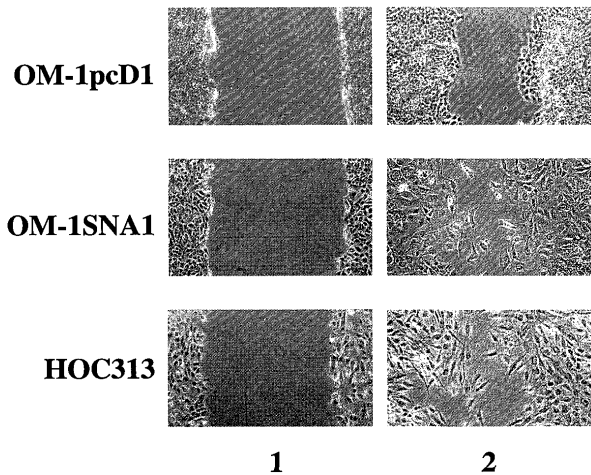


図3 各種扁平上皮癌細胞の遊走能の検討
各扁平上皮癌細胞をコンフルエントになるまで培養し、その24時間後にディッシュの中心部にピペットチップにて wound を形成し、24時間後の状態を位相差顕微鏡にて撮影した。1：wound 形成直後，2：wound 形成24時間後を表す。EMT を獲得した HOC313 細胞および Snail を過剰発現させた細胞は、遊走能の亢進を示した。

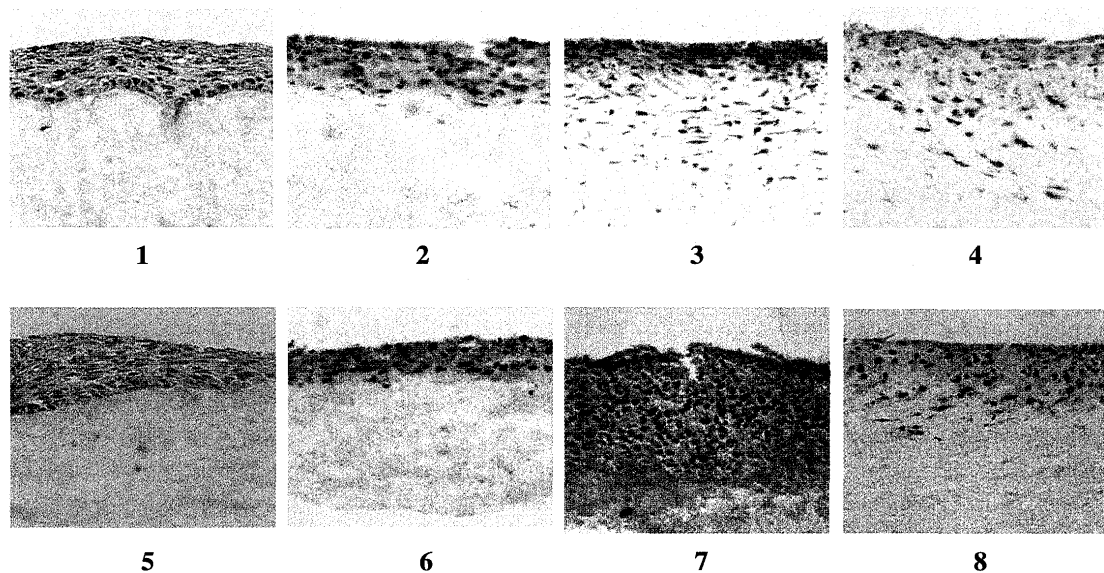


図4 各種扁平上皮癌細胞の浸潤様式の検討
タイプI コラーゲン溶液に不死化歯肉線維芽細胞 GT-1 を懸濁し、コラーゲングルを作製、その上に扁平上皮癌細胞（1：A431, 2：OM-1, 3：HOC313, 4：TSU, 5：A431pcD1, 6：OM-1pcD1, 7：A431SNA1, 8：OM-1SNA1）を重層させ、三次元培養を行った。マイルドホルム®にて固定しパラフィン包埋の後、垂直方向の切片を作製し HE 染色を行った。EMT を獲得した細胞において腫瘍細胞がコラーゲングル内に個々にびまん性に浸潤する像を示した。

ラーゼアッセイにて測定した。いずれの処理によっても 1,714 bp の MMP-2 プロモーター活性は強く誘導された。プロモーター部位を順次欠失させた結果、MMP-2 の転写活性の上昇には -1,248 ~ -1,255 bp の配列が必要であることが示され、この領域に存在する Ets-1 結合配列の関与が示唆された（図 8 B, 8 C, 8 D）。

Ets-1 との関係性をさらに検討するために、Snail および SIP1 を過剰発現させた細胞の核抽出液と MMP-2 プロモーター領域の Ets-1 結合部位を含む DNA を用い EMSA を行った。Snail および SIP1 の発現誘導により

Ets-1 と特異的な結合を示すバンドの増強を認め、Ets-1 抗体の添加によりこのバンドのスーパーシフトを認めた。また、未標識の DNA の過剰添加によりバンドの消失を認めたが、一部の配列を変化させた DNA の添加では消失しなかった。以上のことより、Snail および SIP1 の発現誘導により MMP-2 プロモーターの Ets-1 の配列への結合能が上昇し、MMP-2 の転写活性が上昇することが示された（図 9 A, 9 B）。

次に EMT と Ets-1 の発現の関連について検討を行った。6 種の扁平上皮癌細胞における Ets-1 の遺伝子発現

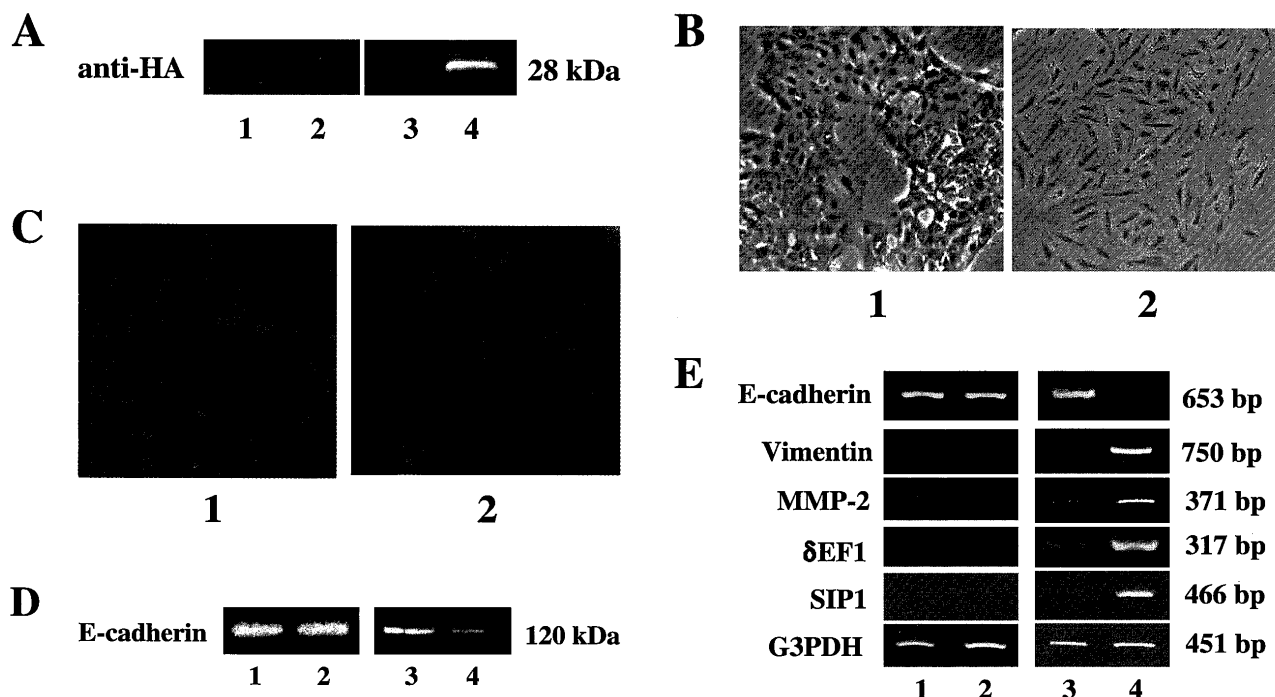


図5 Tet-off-Snail 発現ベクターを導入した A431 細胞の樹立およびその性状の検討
 (A) 培地から doxycycline を除くことで Snail の発現を誘導した。Snail の蛋白発現は、HA タグに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて確認した。レーン 1 : A431-Tet-off-pTRE (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-pTRE (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。
 (B) A431-Tet-off-SNA 細胞の位相差顕微鏡像。1 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, 2 : A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。doxycycline 除去による Snail 発現の誘導細胞は線維芽細胞様形態に変化し、EMT の誘導を認めた。
 (C) 免疫蛍光染色法による A431-Tet-off-SNA 細胞における E-cadherin の蛋白発現の検討。1 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, 2 : A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。Snail の発現誘導に伴い E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた。
 (D) ウェスタンブロッティングによる A431-Tet-off-SNA 細胞における E-cadherin の蛋白発現の検討。レーン 1 : A431-Tet-off-pTRE (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-pTRE (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。Snail の発現誘導に伴い E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた。
 (E) A431-Tet-off-SNA 細胞における E-cadherin, Vimentin, MMP-2, δEF1, SIP1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。レーン 1 : A431-Tet-off-pTRE (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-pTRE (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。Snail の発現誘導に伴い E-cadherin の遺伝子発現の低下, Vimentin, MMP-2, δEF1, SIP1 の遺伝子発現の上昇を認めた。

を検討したところ、高度浸潤型扁平上皮癌においてその高発現を認めた (図10A)。Snail を過剰発現させた細胞においても Ets-1 の遺伝子発現の上昇を認め (図10B), さらに Snail および SIP1 の発現誘導に伴い, Ets-1 蛋白の発現が誘導された (図10C)。また TGF-β の添加によっても Ets-1 の遺伝子発現が上昇した (図10D)。種々の Ets ファミリーの遺伝子発現を検討したところ、高度浸潤型扁平上皮癌における Ets-1 の高い遺伝子発現および E1AF の遺伝子発現の消失を認めたが、その他の Ets ファミリーの遺伝子発現と EMT の間に関連性は認められなかった (図10E)。また Snail および SIP1 の発現を誘導した細胞においても Ets-1 と E1AF の遺伝子発現の逆相関を認めた (図10F)。

4. 扁平上皮癌細胞における Ets-1 の過剰発現による MMP-2 の発現および転写活性の上昇

Ets-1 による MMP-2 の転写活性に対する影響についてさらに検討した。Ets-1 発現ベクターと MMP-2 のプロモーター領域を含むレポーターベクターを用い, A431 細胞に一過性にトランスフェクションし, 転写活性を測定した。Ets-1 結合配列を含む MMP-2 プロモーターにおいて転写活性の明らかな上昇が認められたが、この配列を含まないプロモーターでは活性の上昇は認められなかった (図11A)。さらに扁平上皮癌細胞における Ets-1 の作用を検討するために、これを過剰発現させた A431 細胞を樹立した。Ets-1 蛋白の発現は V5 タグおよび Ets-1 抗体を用いたウェスタンブロッティングによ

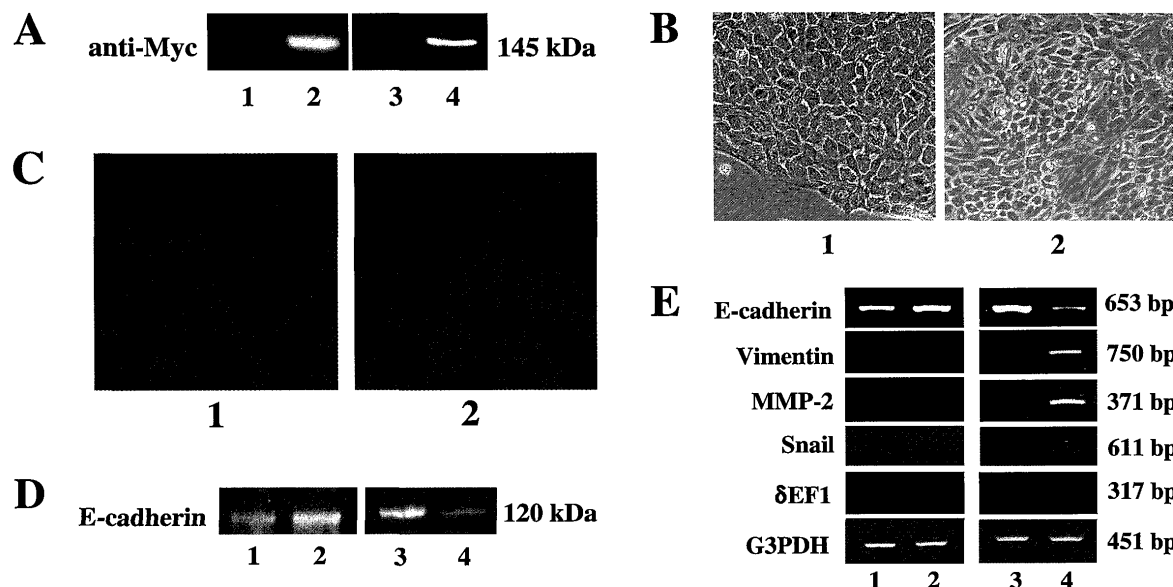


図6 Tet-off-SIP1 発現ベクターを導入した A431 細胞の樹立およびその性状の検討
 (A) 培地から doxycycline を除くことで SIP1 の発現を誘導した。SIP1 の蛋白発現は、Myc タグに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにて確認した。レーン 1 : A431-Tet-off-SIP1/MT (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-SIP1/MT (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。(B) A431-Tet-off-SIP1 細胞の位相差顕微鏡像。1 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, 2 : A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。doxycycline を除去し SIP1 の発現を誘導させた細胞の形態変化は Snail の誘導の場合に比較し顕著ではなかった。(C) 免疫蛍光染色法による A431-Tet-off-SIP1 細胞における E-cadherin の蛋白発現の検討。1 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, 2 : A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。SIP1 の発現誘導に伴い E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた。(D) ウェスタンブロッティングによる A431-Tet-off-SIP1 細胞における E-cadherin の蛋白発現の検討。レーン 1 : A431-Tet-off-SIP1/MT (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-SIP1/MT (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。SIP1 の発現誘導に伴い E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた。(E) A431-Tet-off-SIP1 細胞における E-cadherin, Vimentin, MMP-2, Snail, δ EF1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。レーン 1 : A431-Tet-off-SIP1/MT (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-SIP1/MT (-dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。SIP1 の発現誘導に伴い E-cadherin の遺伝子発現の低下, Vimentin, MMP-2 の遺伝子発現の上昇を認めたが, Snail および δ EF1 の遺伝子発現は変化しなかった。

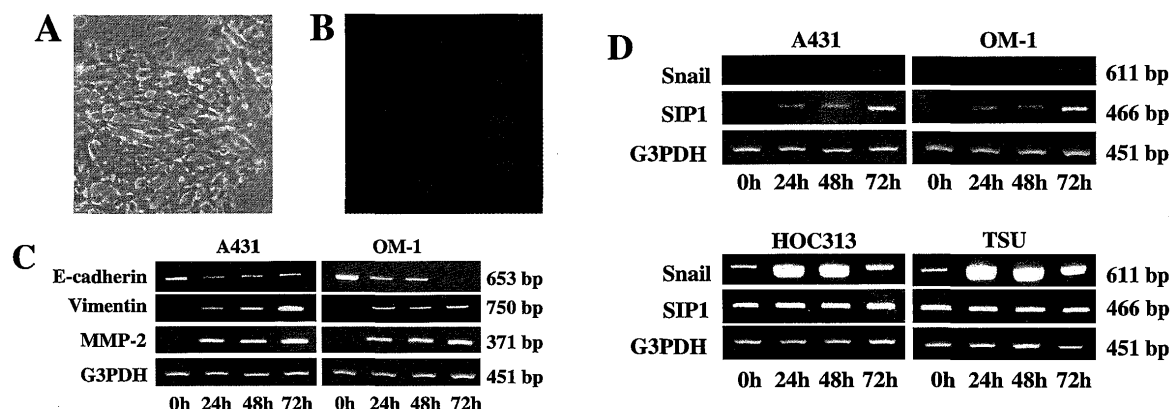


図7 各種扁平上皮癌細胞に対する TGF- β による細胞形態および遺伝子発現の変化
 (A) 培地中に 2 ng/ml の TGF- β を添加した際の A431 細胞の位相差顕微鏡像。細胞形態の変化は Snail の誘導の場合に比較し顕著ではなかった。(B) 免疫蛍光染色法による E-cadherin 蛋白発現の検討。TGF- β 処理により E-cadherin の蛋白発現の低下を認めた。(C) A431 細胞および OM-1 細胞に TGF- β 処理を行い, E-cadherin, Vimentin, MMP-2 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。E-cadherin の遺伝子発現の低下, Vimentin および MMP-2 の遺伝子発現の上昇を認めた。(D) A431 細胞, OM-1 細胞, HOC313 細胞および TSU 細胞に TGF- β 処理を行い, Snail および SIP1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。上皮様形態を示す A431 細胞, OM-1 細胞では SIP1 の遺伝子発現の上昇を認めたが Snail の遺伝子発現は変化しなかった。一方, 線維芽細胞様形態を示す HOC313 細胞, TSU 細胞では Snail の遺伝子発現の上昇を認めたが SIP1 の遺伝子発現は変化しなかった。

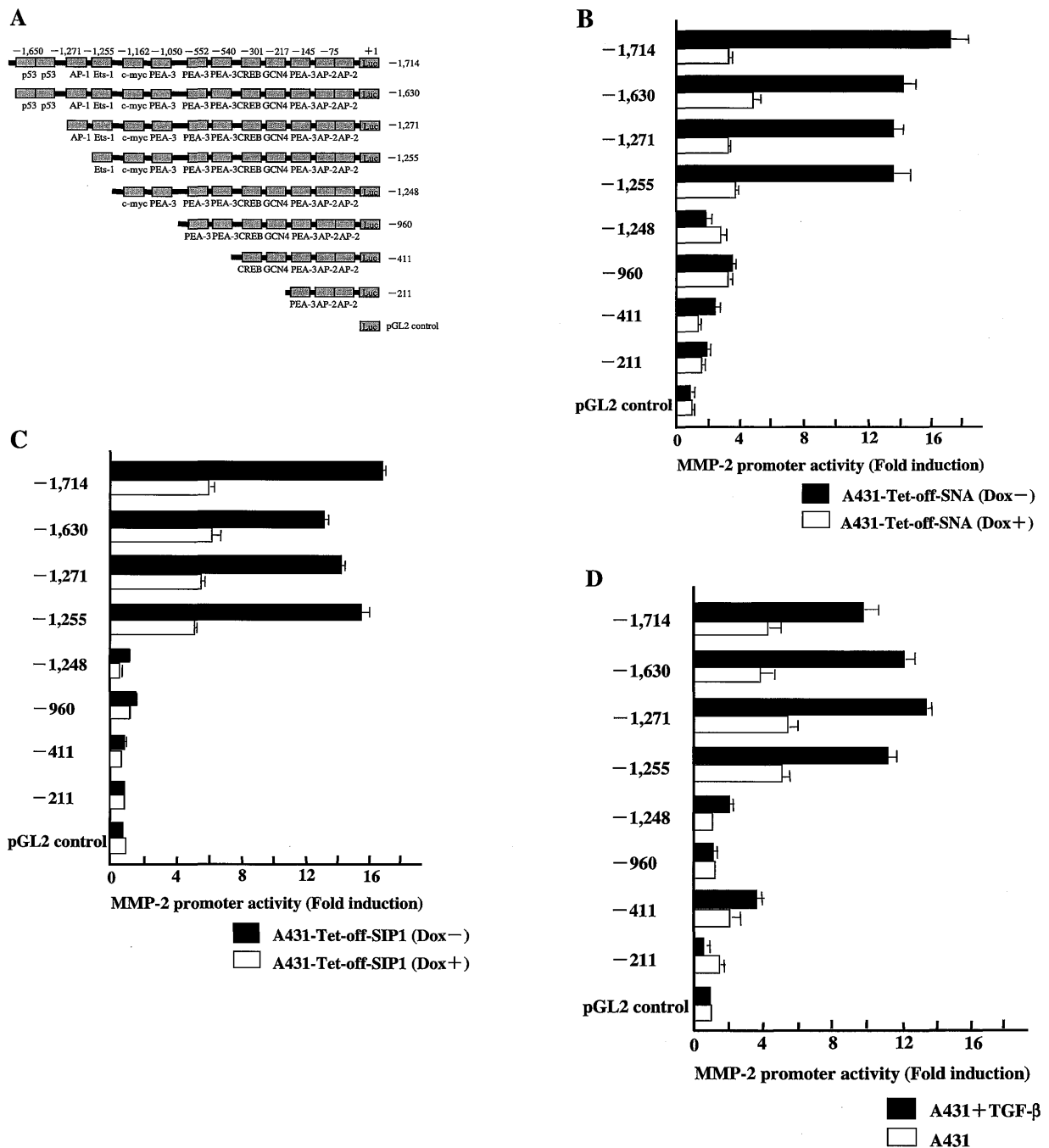


図8 扁平上皮癌細胞における Snail, SIP1 および TGF- β 処理による MMP-2 プロモーター活性の上昇

(A) 転写開始点より1,714 bp 上流までの MMP-2 プロモーターの構造。(B) MMP-2 プロモーターを含むレポーターベクターと pRL-CMV ベクターを A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, あるいは A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞にコトランスフェクションし, 48時間培養後に細胞を回収し転写活性を測定した。□: A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, ■: A431-Tet-off-SNA (-dox) 細胞。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を表す。Snail の発現誘導に伴い-1,248~-1,255 bp の間で MMP-2 の転写活性は上昇し, Ets-1 結合配列の関与が示唆された。(C) MMP-2 プロモーターを含むレポーターベクターと pRL-CMV ベクターを A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, あるいは A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞にコトランスフェクションし, 48時間培養後に細胞を回収し転写活性を測定した。□: A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, ■: A431-Tet-off-SIP1 (-dox) 細胞。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を表す。SIP1 の発現誘導に伴い-1,248~-1,255 bp の間で MMP-2 の転写活性は上昇し, Ets-1 結合配列の関与が示唆された。(D) MMP-2 プロモーターを含むレポーターベクターと pRL-CMV ベクターを A431細胞, あるいは TGF- β 処理を行った A431細胞にコトランスフェクションし, 48時間培養後に細胞を回収し転写活性を測定した。□: A431細胞, ■: A431細胞+TGF- β 。各値は平均値±標準偏差 (n=3) を表す。TGF- β 処理に伴い-1,248~-1,255 bp の間で MMP-2 の転写活性は上昇し, Ets-1 結合配列の関与が示唆された。

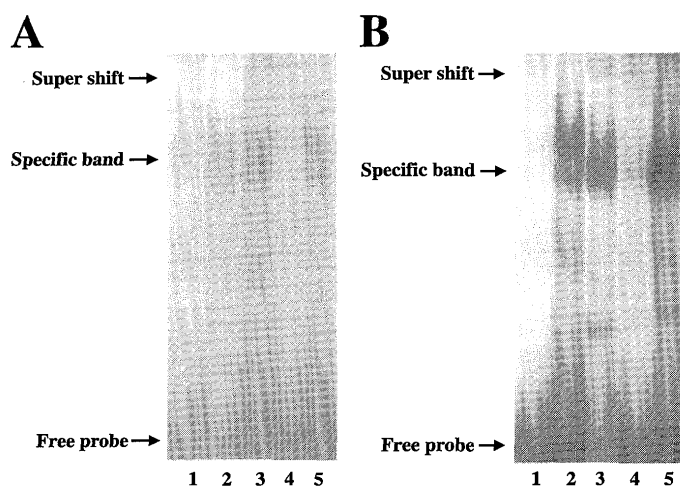


図9 扁平上皮癌細胞における Snail および SIP1 の発現誘導に伴う核抽出液の MMP-2 プロモーターへの結合能の上昇

Snail (A) および SIP1 (B) の発現を誘導した細胞の核抽出液と MMP-2 プロモーター領域の Ets-1 結合部位を含む DNA (−1,261~−1,241bp) を用い EMSA を行った。(A) A431-Tet-off-SNA 細胞。レーン 1 : dox (+)。レーン 2 : dox (−)。レーン 3 : dox (−), Ets-1 抗体添加。レーン 4 : dox (−), 30倍濃度の未標識の DNA を添加。レーン 5 : dox (−), 配列を一部変化させた DNA を添加。(B) A431-Tet-off-SIP1 細胞。レーン 1 : dox (+)。レーン 2 : dox (−)。レーン 3 : dox (−), Ets-1 抗体添加。レーン 4 : dox (−), 30倍濃度の未標識の DNA を添加。レーン 5 : dox (−), 配列を一部変化させた DNA を添加。

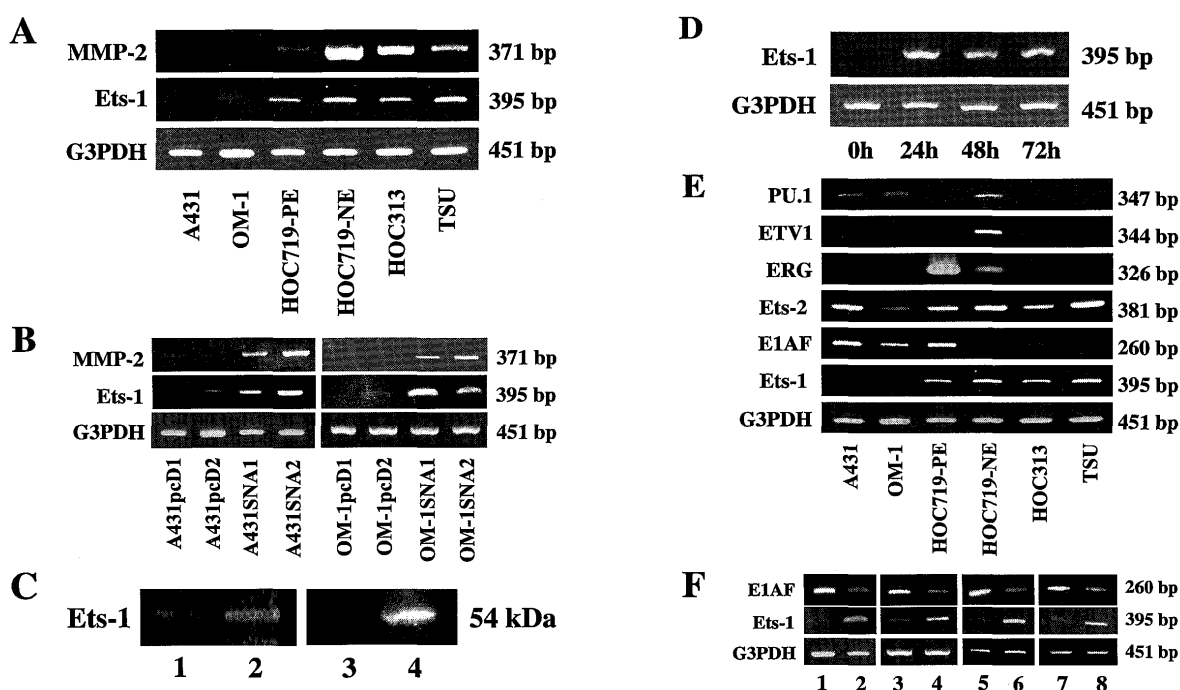


図10 扁平上皮癌細胞における Snail, SIP1 および TGF- β の刺激に伴う Ets-1 発現の上昇

(A) 6種の扁平上皮癌細胞における MMP-2 および Ets-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。高度浸潤型扁平上皮癌細胞において MMP-2 および Ets-1 の高い遺伝子発現を認めた。(B) Snail を過剰発現させた細胞およびコントロールの細胞における MMP-2 および Ets-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。Snail による EMT の誘導に伴い、MMP-2 および Ets-1 の遺伝子発現の上昇を認めた。(C) A431-Tet-off-SNA 細胞および A431-Tet-off-SIP1 細胞において Ets-1 の蛋白発現をウェスタンブロッティングにより検討した。レーン 1 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, レーン 2 : A431-Tet-off-SNA (−dox) 細胞, レーン 3 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, レーン 4 : A431-Tet-off-SIP1 (−dox) 細胞。Snail および SIP1 の発現誘導に伴い Ets-1 の蛋白発現の上昇を認めた。(D) A431 細胞に TGF- β 処理を行い、Ets-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。(E) 6種の扁平上皮癌細胞における種々の Ets ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。PU.1 : PU-box binding factor 1, ETV1 : Ets variant gene 1, ERG : Ets-related gene, Ets-2 : E twenty-six 2, E1AF : E1A enhancer binding protein, Ets-1 : E twenty-six 1。高度浸潤型扁平上皮癌細胞において Ets-1 の高い遺伝子発現および E1AF の遺伝子発現の消失を認めた。(F) Snail を過剰発現させた細胞およびコントロールの細胞, A431-Tet-off-SNA 細胞および A431-Tet-off-SIP1 細胞において Ets-1 と E1AF の遺伝子発現を RT-PCR 法により検討した。レーン 1 : A431pcD1細胞, レーン 2 : A431SNA1細胞, レーン 3 : OM-1pcD1細胞, レーン 4 : OM-1SNA1細胞, レーン 5 : A431-Tet-off-SNA (+dox) 細胞, レーン 6 : A431-Tet-off-SNA (−dox) 細胞, レーン 7 : A431-Tet-off-SIP1 (+dox) 細胞, レーン 8 : A431-Tet-off-SIP1 (−dox) 細胞。Snail および SIP1 の発現誘導に伴い Ets-1 の遺伝子発現の上昇および E1AF の遺伝子発現の低下を認めた。

り確認した(図11B)。Ets-1 発現細胞は細胞形態の明らかな変化は認めなかった(図11C)。また RT-PCR の結果, Ets-1 の過剰発現により Vimentin の遺伝子発現の上昇はみられず, E-cadherin の遺伝子発現はさらに上昇した(図11D)。種々の MMP の遺伝子発現を検討したところ, MMP-1, -3, -7, -9 の遺伝子発現の上昇を認めた(図11E)。

考 察

本研究において, 線維芽細胞様形態を示し, 高度浸潤型の扁平上皮癌細胞である HOC719-NE 細胞, HOC313 細胞, TSU 細胞は, 上皮様形態を示す A431細胞, OM-1 細胞, HOC719-PE 細胞と比較して, E-cadherin の発現の消失, Vimentin, MMP-2, Snail, SIP1, δ EF1 の高い発現を認めた。A431 細胞と OM-1 細胞に Snail を過剰発現させることにより, これらの遺伝子発現の変化を伴う EMT の誘導が認められた。さらに, Snail と SIP1 の Tet-off ベクターを導入した A431 細胞を用いて遺伝子発現を検討したところ, Snail の誘導では安定発現細胞と同様の遺伝子発現および細胞形態の変化を示した。SIP1 の誘導では E-cadherin の発現低下, 細胞接着の低下, Vimentin および MMP-2 の発現上昇を認めたが, Snail および δ EF1 の発現は変化せず, 細胞形態の変化は Snail に比較して顕著ではなかった。さらに, 上皮様形態を示す扁平上皮癌細胞に TGF- β を添加すると, E-cadherin の発現低下, Vimentin, MMP-2, SIP1 の発現上昇を認めたが, Snail の発現の明らかな変化はみられなかった。一方, 線維芽細胞様形態を示す扁平上皮癌細胞に TGF- β を添加すると, Snail の発現上昇を認めたのに対して SIP1 の発現は変化しなかった。

TGF- β は種々の上皮細胞で EMT を誘導することが示されている¹⁹⁻²¹⁾。Xie らはマウスの乳腺細胞である NMuMG 細胞における TGF- β の影響を15,000個の遺伝子を用いたマイクロアレイにて検討を行ったところ, 4 ng/ml の TGF- β 添加にて Akt, Ets-1, RhoB, CyclinD3 および Fibronectin などの発現が上昇し, E-cadherin, CyclinD2 および c-myc などの発現が低下することを報告している²¹⁾。また, TGF- β による Snail および SIP1 の発現への影響についてもいくつかの報告がされている。Peinado らは TGF- β がイヌの腎臓細胞である MDCK 細胞において Snail の発現上昇を伴って EMT を誘導すること, その過程において ERK1/2 および Akt を介した MAPK シグナルが関与することを報告している²²⁾。また, TGF- β により NMuMG 細胞で EMT が誘導されるが, その際 Snail の発現は変化せず, SIP1 の発現が上昇すること¹⁴⁾, さらに肝細胞において TGF- β により増殖の抑制と Snail の発現が上昇することが報告されている²³⁾。一方で Snail による EMT の誘導では, δ EF1 の発現および転写活性は上昇するが, SIP1 の発現は変化しないという報告もある²⁴⁾。

これらの結果より Snail と SIP1 の相互関係あるいは TGF- β によるこれらの遺伝子発現に対する影響は, 由来する組織特異的な細胞の性格に依存することが考えられた。本研究では, 扁平上皮癌細胞における TGF- β による EMT の誘導は SIP1 を介していると示唆された。しかし, Snail は A431 細胞の線維芽細胞様形態への変化を強く誘導するのに対し, SIP1 と TGF- β は, 細胞間接着の低下を誘導するものの, Snail に比較し細胞の形態変化が顕著ではなかった。Guaita らは, Snail と δ EF-1 を過剰発現させた場合を比較すると, E-cadherin の転写活性の抑制能は Snail の方が δ EF-1 より高く, EMT の誘導能が強いことを報告している²⁴⁾。本研究の結果とこれらの報告を合わせると, 扁平上皮癌細胞では Snail による EMT の誘導能には, SIP1 による EMT とは異なる経路が存在することが考えられた。

次に EMT の誘導に伴う MMP-2 の発現上昇のメカニズムについて検討を行った。浸潤・転移能の高い癌細胞において MMP-2 の発現と活性が高いことは多数報告されている^{12, 30, 31)}。当教室においてもこれまでに, 線維芽細胞様形態を示す扁平上皮癌細胞において MMP-2 の発現と活性が高く, Snail による EMT の誘導によっても MMP-2 の発現が誘導されることを報告してきた¹²⁾。またマウスの乳腺上皮細胞である Eph4 細胞では, TGF- β による EMT の誘導に伴って, E-cadherin, Occludin の発現が低下し, Vimentin, MMP-2 および Snail の発現が上昇することが報告されている⁴⁰⁾。本研究においては, MMP-2 の発現は Snail, SIP1 および TGF- β によって上昇することが明らかになった。MMP-2 のプロモーター領域を含むレポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果, Snail, SIP1, TGF- β の全てに共通して, 転写開始点より上流1,255~1,248 bp に存在する Ets-1 の結合配列が関与していることが示唆された。より短いプロモーター領域を用いた Yokoyama らの報告¹²⁾ では, MMP-2 プロモーターの-411~-262 bp における Snail による約2倍の活性の上昇を認めたが, 本研究において1,714 bp 上流領域までの検討を行った結果, Ets-1 の結合配列を介した10倍以上の活性の上昇が示された。また, 核抽出液のこの配列への結合能は Snail と SIP1 誘導によって上昇し, この DNA・蛋白複合体には Ets-1 蛋白が含まれること, さらに Ets-1 の発現は EMT に伴って誘導されることが示された。これらの結果より, 扁平上皮癌細胞における EMT による MMP-2 の発現および転写活性の上昇機構においては Ets-1 が EMT のエフェクターとして働き, これを誘導することが明らかとなった。EMT によって Ets-1 の発現が上昇し, 他の Ets ファミリーに属する転写因子 E1AF の発現低下がみられたことから, MMP-2 のプロモーター領域の Ets-1 結合配列に対する Ets-1 と E1AF の競合的な負の関係も考えられる。しかし, Ets-1 の遺伝子導入実験の結果, Ets-1 が単独で MMP-2 の転写活性を上昇させることが明らかに

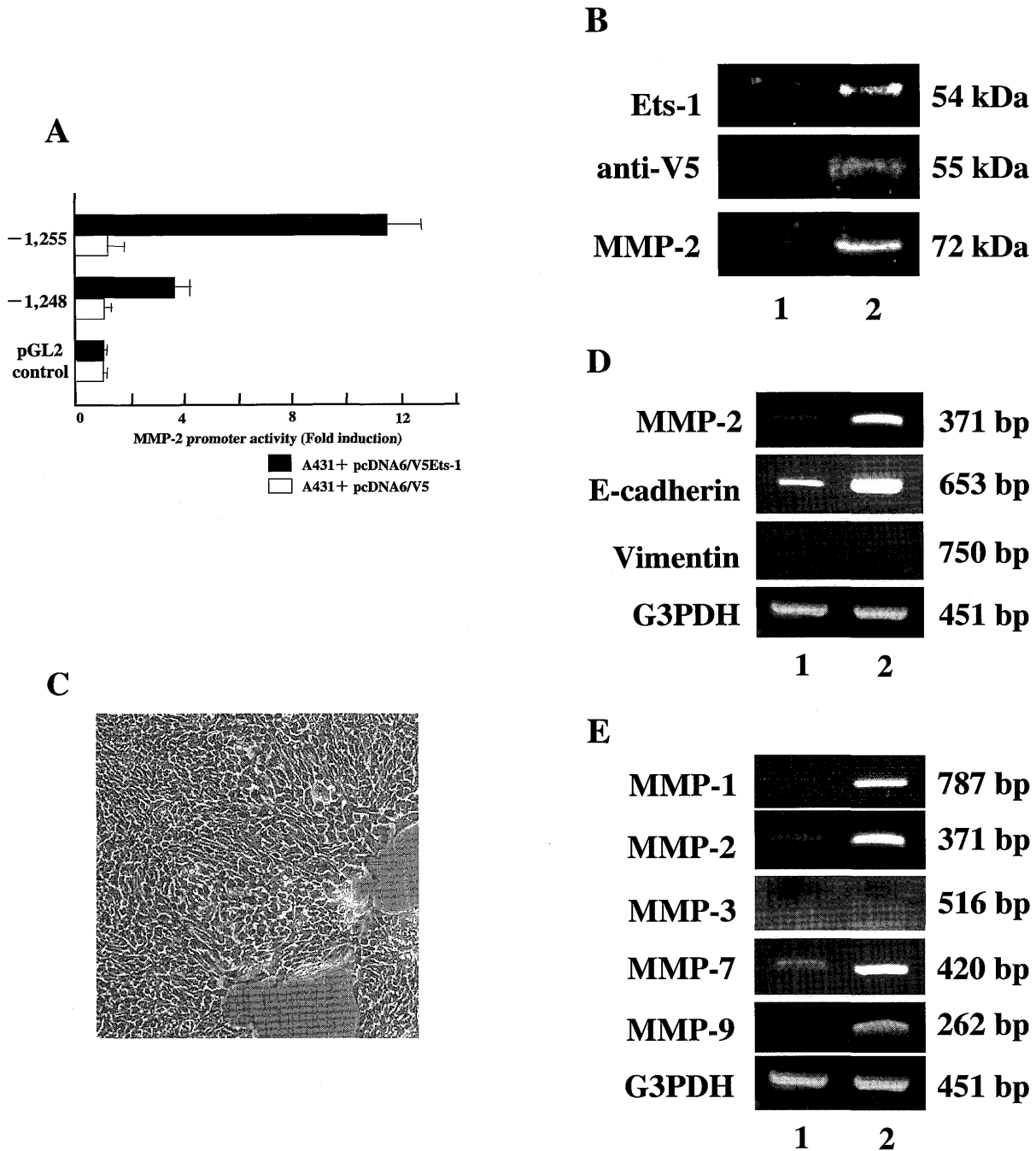


図11 扁平上皮癌細胞における Ets-1 の過剰発現による MMP-2 の発現および転写活性の上昇
 (A) MMP-2 プロモーターを含むレポーターベクター (+22~-1,248 bp および +22~-1,255 bp) と、pcDNA6/V5Ets-1 あるいは pcDNA6/V5 ベクターおよび pRL-CMV ベクターを A431 細胞にコトランスフェクションし、48 時間培養後に細胞を回収し転写活性を測定した。□: A431 細胞 + pcDNA6/V5 ベクター, ■: A431 細胞 + pcDNA6/V5Ets-1 ベクター。各値は平均値 ± 標準偏差 (n = 3) を表す。Ets-1 結合配列を含む MMP-2 プロモーターにおいて MMP-2 の転写活性の上昇を認めた。(B) Ets-1 過剰発現細胞 (レーン 2: A431Ets-1) における Ets-1 の蛋白発現は、Ets-1 および V5 タグに対する抗体を用いたウェスタンブロットングにて確認した。レーン 1 はコントロールの細胞 (A431pcDV5) を表す。Ets-1 過剰発現細胞において MMP-2 抗体を用いたウェスタンブロットングにてコントロールに比較しその蛋白発現の上昇を認めた。(C) Ets-1 を過剰発現させた A431 細胞の位相差顕微鏡像。明らかな細胞形態の変化は認めなかった。(D) Ets-1 を過剰発現させた細胞およびコントロールの細胞における MMP-2, E-cadherin, Vimentin の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。レーン 1: A431pcDV5 細胞, レーン 2: A431Ets-1 細胞。Ets-1 を過剰発現させた細胞において MMP-2 および E-cadherin の遺伝子発現の上昇を認めた。(E) Ets-1 を過剰発現させた細胞およびコントロールの細胞における MMP-1, -2, -3, -7, -9 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。レーン 1: A431pcDV5 細胞, レーン 2: A431Ets-1 細胞。Ets-1 を過剰発現させた細胞はこれらすべての遺伝子発現の上昇を認めた。

なった。

いくつかの転写因子がMMP-2のプロモーター活性を上昇させることが示されている⁴¹⁻⁴⁸⁾。Mertensらは肝細胞癌において、ラットのMMP-2プロモーターでAP-2, p53, YB-1の複合体がRE-1の結合配列に結合することにより、その転写活性を上昇させること⁴⁴⁾、Reisdoffらはラットのメサングウム細胞において、-1,053~-1,004 bpに存在するEts-1結合配列が関与し、プロモーター活性、発現を上昇させ、Ets-1の一過性の導入にてMMP-2の発現が上昇することを報告している⁴⁵⁾。Wangらは神経膠芽腫細胞を用いて、1,716 bpのMMP-2プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイによって、IGFBP2によりその活性が上昇すること⁴⁶⁾、Xieらはメラノーマの細胞ではMMP-2プロモーターにStat3が結合することにより、その転写活性を上昇させることを報告している⁴⁷⁾。また最近、膵臓癌においてプロスタグランジンE2の刺激によりEts-1を介してMMP-2の転写活性、発現が上昇することが示されている⁴⁸⁾。Ets蛋白はets領域と呼ばれる85個のアミノ酸配列を持ち、このDNA結合ドメインを介してGGA (A/T) 配列に結合し下流の遺伝子の転写を制御する転写因子である⁴⁹⁻⁵²⁾。ets-1遺伝子は、トリ白血ウイルスであるE26からv-etsのホモログとして単離されたがん遺伝子であり、血管内皮細胞においてMMP-1, -3, -9およびuPAの結合配列に作用し発現を上昇させることが報告されている⁵³⁻⁵⁵⁾。また、EMTを獲得した肺癌細胞および浸潤能の高い癌においてEts-1の発現が上昇していることが報告されている⁵⁶⁻⁵⁹⁾。本研究では、Ets-1を過剰発現させたA431細胞はMMP-1, -2, -3, -9の発現上昇を示したが、これまでに扁平上皮癌細胞においてEMTとMMP-9の発現の相関は認められていない⁵⁾。また、MMP-1, -3の発現とEMTとの相関も認められなかった(結果は示さない)。Ets-1の結合配列は、いくつかのMMPのプロモーター領域に存在するが、TATA-boxやNF- κ Bの結合部位はMMP-1, -3, -9のプロモーターには存在するものの、MMP-2には存在しない⁶⁰⁻⁶²⁾。これらのことより、MMP-2以外のMMPの発現はEMTとの相関が低く、Ets-1の作用が異なるか、あるいは他の転写因子の影響を受けることが示唆された。

注目すべきことに、MMP-2を除いてはEts-1の過剰発現によってVimentinなどの発現や細胞形態の変化は誘導されず、むしろE-cadherinの発現は上昇した。これらの結果はEts-1の発現上昇はEMTによる一つの効果であり、Ets-1自身には扁平上皮癌細胞に対してEMTを誘導しないことを示している。すなわち、Ets-1はEMTの誘導能を有さないが、EMTに伴って扁平上皮癌を高悪性化に向かわせる因子のひとつであると考えられる。以上のことより、扁平上皮癌細胞においてEMTは独立した多数のシグナル伝達経路を同時に活性化することにより、悪性度を上昇させることが示された。今後EMTに

関わる様々なシグナル伝達経路を追及・解明することにより、これをターゲットとした治療法を開発し、高度浸潤型扁平上皮癌の治療成績の向上が期待できると考えられる。

結 論

扁平上皮癌細胞におけるEMTによる高悪性化機構について検討し、以下の結果を得た。

1. 上皮様形態を示す扁平上皮癌細胞に比較し高度浸潤型の扁平上皮癌細胞は、線維芽細胞様形態、高い遊走能および浸潤能、E-cadherinの発現の消失、Vimentin, MMP-2, Snail, SIP1, δ EF-1の高い発現を示した。
2. Snailは、扁平上皮癌細胞に対してE-cadherinの発現低下、Vimentin, MMP-2, SIP1, δ EF-1の発現上昇を伴ってEMTを誘導した。
3. SIP1およびTGF- β は、扁平上皮癌細胞に対してE-cadherinの発現低下、Vimentin, MMP-2の発現上昇と細胞接着の低下を誘導したが、Snailの発現は変化させなかった。
4. TGF- β は上皮様形態を示す扁平上皮癌細胞においてSIP1の発現を上昇させたが、Snailの発現は変化しなかった。一方、高度浸潤型の扁平上皮癌細胞に対してはSnailの発現上昇を誘導したが、SIP1の発現は変化させなかった。
5. Snail, SIP1, TGF- β はMMP-2の発現と転写活性を誘導した。MMP-2プロモーターの解析の結果、この誘導では共通に-1,248~-1,255 bpのEts-1結合配列を介していることが明らかとなった。
6. Snail, SIP-1, TGF- β により扁平上皮癌細胞においてEts-1の蛋白と遺伝子の発現が上昇した。
7. SnailとSIP1の発現誘導により、MMP-2プロモーターへの核抽出液の結合活性が上昇し、DNA・蛋白複合体にはEts-1が含まれることが明らかになった。
8. EMTの誘導によりE1AFの発現低下を認め、Ets-1とE1AFの逆相関が示された。
9. Ets-1はMMP-2の発現を誘導するが、Ets-1自身には扁平上皮癌細胞に対するEMT誘導能がないことが示された。

以上のことから、扁平上皮癌細胞においてEMTは細胞間接着因子の発現低下、基質分解能、細胞遊走能の亢進を介して、癌の高悪性化に関わっていることが示された。その過程で転写因子Ets-1が誘導されること、Ets-1はMMP-2のプロモーターに存在する結合配列を介してMMP-2の転写活性を上昇させることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導、御校閲を賜った徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面外科学分野 長山 勝教授に深甚なる謝意を表しますとともに、懇切なる御高閲、御助言をい

ただきました分子医化学分野野間隆文教授, 分子薬理学分野 吉本勝彦教授に深謝いたします。また本研究の実施に際し終始, 直接御指導をいただいた口腔顎顔面外科学分野 鎌田伸之助教授 (現 広島大学大学院医歯薬学総合研究科口腔外科学教室教授) に甚大なる謝意を表しますとともに, 本研究のために御協力頂いた口腔外科学第一講座の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA and Cano A: A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276, 27424-27431 (2001)
- 2) Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A and Weinberg RA: Twist, a master regulator of morphogenesis, play an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939 (2004)
- 3) Savagner P: Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912-923 (2001)
- 4) Shook D, and Keller R: Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120, 1351-1383 (2003)
- 5) Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R and Nagayama M: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol* 37, 65-71 (2001)
- 6) Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J and Nieto MA: Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-3246 (2002)
- 7) Jiao W, Miyazaki K and Kitajima Y: Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 86, 98-101 (2002)
- 8) Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T and Konishi I: Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 163 1437-1447 (2003)
- 9) Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Lacascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA: The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83 (2000)
- 10) Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J and Garcia de Herreros A: The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-89 (2000)
- 11) Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R and Bosserhoff AK: Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276, 24661-24666 (2001)
- 12) Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H and Nagayama M: Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 22, 891-898 (2003)
- 13) Postigo AA and Dean DC: Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6391-6396 (2000)
- 14) Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D and van Roy F: The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278 (2001)
- 15) Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y and Miyazaki K: Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 90 1265-1273 (2004)
- 16) Zwijsen A, van Grunsven LA, Bosman EA, Collart C, Nelles L, Umans L, Van de Putte T, Wuytens G, Huylebroeck D and Verschueren K: Transforming growth factor beta signaling in vitro and in vivo: activin ligand-receptor interaction, Smad5 in vasculogenesis, and repression of target genes by the deltaEF1/ZEB-related SIP1 in the vertebrate embryo. *Mol Cell Endocrinol* 180, 13-24 (2001)
- 17) Verschueren K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC and Huylebroeck D: SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequence in candidate target genes. *J Biol Chem* 274, 20489-20498 (1999)
- 18) Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ and Kroll KL: Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* 22, 2453-2462 (2003)
- 19) Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR and Derynck R: TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127, 2021-2036 (1994)
- 20) Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH and ten Dijke P: TGF- β type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J*

- Cell Sci 112, 4557-4568 (1999)
- 21) Xie L, Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA and Moses HL: Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Res* 5, R187-198 (2003)
 - 22) Peinado H, Quintanilla M and Cano A: Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-21123 (2003)
 - 23) Spagnoli FM, Cicchini C, Tripodi M and Weiss MC: Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF β is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J Cell Sci* 113, 3639-3647 (2000)
 - 24) Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Battle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG and Baulida J: Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* 277, 39209-39216 (2002)
 - 25) Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M and Tsukita S: Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116, 1959-1967 (2003)
 - 26) Ohkubo T and Ozawa M: The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* 117, 1675-1685 (2004)
 - 27) Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P and Ben-Ze'ev A: Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163, 847-857 (2003)
 - 28) Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G and Gress TM: Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61, 4222-4228 (2001)
 - 29) Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S and Nagayama M: Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 94, 593-597 (2003)
 - 30) Azzam HS, Arand G, Lippman ME and Thompson EW: Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 85, 1758-1764 (1993)
 - 31) Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML and Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1149 (2000)
 - 32) Kamata N, Chida K, Rikimaru K, Horikoshi M, Enomoto S and Kuroki T: Growth inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res* 46, 1648-1653 (1986)
 - 33) Hoteiya T, Hayashi E, Satomura K, Kamata N and Nagayama M: Expression of E-cadherin in oral cancer cell lines and its relationship to invasiveness in SCID mice in vivo. *J Oral Pathol Med* 28, 107-111 (1999)
 - 34) Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M and Yasumoto S: Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med* 33, 417-423 (2004)
 - 35) Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ and Nakatsuji T: Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211, 1052-1054 (1981)
 - 36) Tsunenaga M, Kohno Y, Horii I, Yasumoto S, Huh NH, Tachikawa T, Yoshiki S and Kuroki T: Growth and differentiation properties of normal and transformed human keratinocytes in organotypic culture. *Jpn J Cancer Res* 85, 238-244 (1994)
 - 37) Dignam JD, Lebovitz RM and Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-1489 (1983)
 - 38) Kamata N, Jotte RM, Holt JT: Myristylation alters DNA-binding activity and transactivation of FBR(gag-fos) protein. *Mol Cell Biol* 11, 765-772 (1991)
 - 39) Kamata N, Holt JT: Inhibitory effect of myristylation on transrepression by FBR(Gag-Fos) protein. *Mol Cell Biol* 12, 876-882 (1992)
 - 40) Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Ludemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H and Kraut H: Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 22, 7155-7169 (2003)
 - 41) Bian J and Sun Y: Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol* 17, 6330-6338 (1997)
 - 42) Mertens PR, Harendza S, Pollock AS and Lovett DH: Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem* 272, 22905-22912 (1997)
 - 43) Qin H, Sun Y and Benveniste EN: The transcriptional

- factor Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274, 29130-29137 (1999)
- 44) Mertens PR, Steinmann K, Alfonso-Jaume MA, En-Nia A, Sun Y and Lovett DH: Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *J Biol Chem* 277, 24875-24882 (2002)
- 45) Reisdorff J, En-Nia A, Stefanidis I, Floege J, Lovett DH and Mertens PR: Transcription factor Ets-1 regulates gelatinase a gene expression in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 13, 1568-1578 (2002)
- 46) Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN and Zhang W: Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* 63, 4315-4321 (2003)
- 47) Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R and Huang S: Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23, 3550-3560 (2004)
- 48) Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW and Whang EE: Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 64, 7439-7446 (2004)
- 49) Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M and Fujinaga K: Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* 10, 1461-1463 (1995)
- 50) Habelhah H, Okada F, Kobayashi M, Nakai K, Choi S, Hamada J, Moriuchi T, Kaya M, Yoshida K, Fujinaga K and Hosokawa M: Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene* 18, 1771-1776 (1999)
- 51) Barrett JM, Pugalia MA, Singh G and Tozer RG: Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 72, 227-232 (2002)
- 52) Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Risberg B, Ben-Baruch G and Reich R: Coordinated expression of integrin subunits, matrix metalloproteinases (MMP), angiogenic genes and Ets transcription factors in advanced-stage ovarian carcinoma: a possible activation pathway? *Cancer Metastasis Rev* 22, 103-115 (2003)
- 53) Iwasaka C, Tanaka K, Abe M and Sato Y: Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 169, 522-531 (1996)
- 54) Oda N, Abe M and Sato Y: ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* 178, 121-132 (1999)
- 55) Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J and Wernert N: The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP1 and MMP9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 194, 43-50 (2001)
- 56) Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brunner N and Thompson EW: Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 15, 519-526 (1997)
- 57) Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, Manase K, Yamashita S, Endo T and Kudo R: Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol Oncol* 79, 256-263 (2000)
- 58) Behrens P, Rothe M, Florin A, Wellmann A and Wernert N: Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1, MMP-9 expression. *Int J Mol Med* 8, 149-154 (2001)
- 59) Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Wernert N and Bosserhoff AK: The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 61, 118-128 (2004)
- 60) Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, Seiki M and Muschel RJ: Tumor cell contact mediated transcriptional activation of the fibroblast matrix metalloproteinase-9 gene: involvement of multiple transcription factors including Ets and alternating purine-pyrimidine repeat. *Clin Exp Metastasis* 16, 169-177 (1998)
- 61) Bond M, Chase AJ, Baker AH and Newby AC: Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3, and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 50, 556-565 (2001)
- 62) Campbell SE, Nasir L, Argyle DJ and Bennett D: Molecular cloning and characterization of canine metalloproteinase-9 gene promoter. *Gene* 273, 81-87 (2001)